

Chalara paradoxaの生産する生澱粉分解酵素とその 応用に関する研究

著者	門間 充
号	394
発行年	1990
URL	http://hdl.handle.net/10097/16677

氏 名(本籍) 門 間 充

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 3 9 4 号

学位授与年月日 平 成 2 年 7 月 19 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 Chalara paradoxa の生産する生澱粉分解
酵素とその応用に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 一 島 英 治
教 授 伊 崎 和 夫
教 授 小 島 邦 彦

論文内容要旨

序論

澱粉は植物によって自然界に豊富に産生され、食糧資源としてばかりでなく、工業原料やエネルギー源として高度に利用されている重要な生物資源である。わが国の澱粉消費量の半分以上はぶどう糖、異性化糖、水飴などの糖化用として用いられている。最近では澱粉からのエタノール生産が世界的に注目され、なかでも省エネルギー化や工程の簡素化のために生澱粉を加熱糊化することなく酵素を用いて直接糖化する無蒸煮糖化法が注目されている。生澱粉分解酵素の研究は *Aspergillus awamori* や *Rhizopus* sp. などのカビの生産する酵素の先駆的な研究以来、*Bacillus circulans*, *Streptococcus bovis*, *Aspergillus* sp. などいくつかの微生物起源の生澱粉分解酵素が報告されている。現在、これらの酵素を用いて生澱粉分解作用を酵素化学的に明らかにするための研究、あるいは無蒸煮エタノール醗酵への応用のための研究が盛んに行なわれている。このような状況の中で、貝沼らはパプア・ニューギニアのサゴヤシの樹幹よりカビの一種 *Chalara paradoxa* を生澱粉分解酵素生産菌として発見した*。培養濾液を検討した結果、それまでに報告されている酵素と比較して高い生澱粉分解活性を持つことが報告された。

本研究では、*C. paradoxa* 生澱粉分解酵素に含まれるグルコアミラーゼを精製し酵素化学的な検討を行ない性質を明らかにするとともに、活性中心のサブサイト構造を検討した。また、本酵素を用いて分解した澱粉粒の微細構造について電子顕微鏡により検討を加えた。さらに、 α -アミラーゼを分離して、生澱粉分解能をグルコアミラーゼと比較して検討するとともに、本酵素を用いた無蒸煮エタノール醗酵への応用を試験した。

第 I 編 *Chalara paradoxa* 生澱粉分解酵素に関する研究

I-1 *Chalara paradoxa* グルコアミラーゼの精製と性質¹⁾

C. paradoxa 生澱粉分解酵素の粗酵素標品からポリエチレングリコール沈澱、DEAE-セルロースイオン交換樹脂吸着、 α -シクロデキストリン（以下CDと略す）-セファロース6Bを用いたアフィニティークロマトグ

* K.Kainuma, H.Ishigami and S.Kobayashi, J. Jpn. Soc. Starch Sci., 32, 136 (1985)

ラフィーによりアミラーゼ活性画分を分離した後、CM-セファロース 6B と Polybuffer-74 を用いたクロマトフォーカシングを行なうことにより、等電点電気泳動的にはほぼ単一の 6 つのグルコアミラーゼ (A1, A2, ..., A6) を精製した (図 1、図 2)。これらのグルコアミラーゼには等電点および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量に違いが認められた。これらのうちの A1, A2, A3 について、アミノ酸組成、キモトリプシンおよび V8 プロテアーゼによるペプチドマップを検討したがほとんど違いは認められなかった。また、グルコアミラーゼ A1 の抗体を作成し免疫交差反応を検討したが、A1, A2, A3 いずれとも交差反応を示しこれらの成分は免疫的にも同等と考えられた。さらに、N-末端より 10~11 残基のアミノ酸配列を気相シークエンサーにより決定し比較を行なったがグルコアミラーゼ A1, A2, A3 とともに全く同一の配列であった (図 3)。以上の結果より、*C. paradoxa* グルコアミラーゼは同じ遺伝子より合成された後、プロテアーゼによる C-末端部分の分解等、なんらかの修飾を受けたため多様性を示すものと推定された。

I-2 *Chalara paradoxa* グルコアミラーゼの反応速度論的解析²⁾

直鎖の各種マルトオリゴ糖を基質として速度論的パラメーターを求め (表 1、図 4)、*C. paradoxa* グルコアミラーゼ A1 のサブサイト構造を検討した。その結果、本グルコアミラーゼは 3 個以上のサブサイトを持ち、サブサイト親和力 A_1 が 0.05 kcal/mol、 A_2 が $A_1 \sim A_{10}$ の中で最も大きい 4.99 kcal/mol を示した (表 2、図 5)。これらのサブサイト親和力の値はこれまで報告されている *Rhizopus delemar* および *Rhizopus niveus* グルコアミラーゼと同様の傾向を示し、グルコアミラーゼにおけるサブサイト構造の共通性を明らかにした。マルトシル α -CD (G_2 - α -CD) の分解における k_o/K_m の値は *C. paradoxa* グルコアミラーゼの方が *R. niveus* グルコアミラーゼの約 25 分の 1 程度であった (表 3)。また、*C. paradoxa* グルコアミラーゼ A1 について各種 CD (α -CD、 β -CD、 γ -CD) を用いた阻害実験を *R. niveus* グルコアミラーゼと比較検討して行なった結果、CD による活性阻害は両者に対して拮抗阻害であり、 K_i の値は *C. paradoxa* グルコアミラーゼに対しては α -CD $>$ β -CD、 γ -CD であり、*R. niveus* グルコアミラーゼに対しては α -CD、 β -CD $<$ γ -CD であった (表 4)。これらの k_o/K_m 、 K_i の値は *C. paradoxa* グルコアミラーゼが *R. niveus* グルコアミラーゼよりも立体的に大きな基質を活性部位に結合し易いことを示している。すなわち、本酵素は生澱粉粒のアミロースあるいはアミロペクチンを活性部位に取り込み易く、生澱粉分解性が高いと考察された。

I - 3 *Chalara paradoxa* グルコアミラーゼを用いた澱粉粒の構造解析^{3), 4)}

蛍光色素 フルオレセイン-イソチオシアネートでラベルした *C. paradoxa* グルコアミラーゼを各種澱粉粒に作用させ、分解反応時における本酵素の局在性を検討した結果、本酵素は澱粉粒の特定の部位に吸着するのではなく表面にほぼ均一に分布することが観察された(図6)。つづいて、電子顕微鏡を用いて本酵素によるトウモロコシ澱粉粒の分解過程を検討した。その結果、はじめに粒の表面の一部に酵素が作用し穴をあけ、澱粉粒の成長リングと呼ばれる層の一層を横方向に円形の穴を拡げるように分解し、ある程度穴が大きくなったところで次の層の表面に穴を同様にあけて進行するのが観察された(図7)。このことは澱粉粒は縦方向よりも横方向の方がアミラーゼに対して弱いためであり、また穴がほぼ円形であることは成長リングが横方向に均一な構造を持つためと考察された。同様にしてできた多数の穴が互いに融合して分解後期には粒内部が空洞な構造となることを示した。さらに、分解を受けた澱粉粒の断面を検討し、トウモロコシ澱粉粒はアミラーゼの分解を受けにくい層と分解を比較的受け易い層が交互に繰り返している構造であり、分解を受けにくい層がそれぞれ完全に独立しているのではなく互いに結合した部分を持つことを明らかにした(図8)。

I - 4 *Chalara paradoxa* α -アミラーゼの分離と性質⁵⁾

Butyl-Toyopearl 650M を用いた疎水クロマトグラフィーにより *C. paradoxa* 生澱粉分解酵素の α -アミラーゼ画分をグルコアミラーゼと分離することができた(図9)。得られた α -アミラーゼはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的にほぼ単一であった。これらの α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ画分を用いて生澱粉分解能をコメ、トウモロコシ、サゴ、ジャガイモの生澱粉を基質として検討した。その結果、澱粉の種類によって分解率の差が認められた。2%の生澱粉を10単位/mlの酵素濃度で分解した場合、最もよく分解を受けたのはコメ澱粉であり40℃で24時間の反応で約92%分解され、以下、トウモロコシ、サゴ、ジャガイモの順であった。グルコアミラーゼについても同様にコメ、トウモロコシ、サゴ、ジャガイモの順で分解された。*C. paradoxa* α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼと市販の種々のアミラーゼおよびプルラナーゼを用いてトウモロコシ生澱粉分解作用を単独および組み合わせて検討した。その結果、単独では *C. paradoxa* グルコアミラーゼは検討したアミラーゼ類の中で最も生澱粉分解性が優れており、トウモロコシ生澱粉を8時間の反応で *R. niveus* グルコアミラーゼの約4倍の効率で分解した。

相乗作用は *C. paradoxa* α -アミラーゼと *C. paradoxa* グルコアミラーゼとの間で顕著に観察された(図10)。さらに、*C. paradoxa* α -アミラーゼと *R. niveus* グルコアミラーゼとの間においても同様の相乗作用が観察された。

第II編 *Chalara paradoxa* 生澱粉分解酵素の応用に関する研究

II-1 *Chalara paradoxa* 生澱粉分解酵素を用いたトウモロコシ生澱粉の無蒸煮エタノール醗酵⁶⁾

C. paradoxa 生澱粉分解酵素を無蒸煮エタノール醗酵へ応用するための条件の検討を行なった。はじめに、トウモロコシ生澱粉の糖化試験を行ない24時間の反応で10%の濃度の基質を90%以上分解することを示した(図11)。さらに、酵母を加えて酵素量および温度、初醗酵母濃度等を検討した結果、50 mlの反応系では生澱粉濃度は20%以下、温度は40℃、酵素量は625単位、酵母濃度は 0.6×10^9 /mlの条件が適当と考察された。パン酵母および酒酵母を用いて最適条件下で醗酵を行なうと85%以上の効率でエタノールを生成することができた(表5)。

II-2 α -CDセファロース6Bを用いた *Chalara paradoxa* 生澱粉分解酵素の再利用⁷⁾

本酵素の精製の過程で α -CDをリガンドとするセファロース6Bカラムに酵素が効率よく吸着することが明らかとなっているので、酵素を有効に再利用するための手段として本酵素をこのカラムを用いて吸着させ回収を行ないエタノール醗酵に再利用をすることを検討した。吸着および脱着の条件を検討した結果、pH 4~8、温度10~40℃の範囲で α -CD溶液等で90%以上の活性を回収することができた。さらに、エタノール存在下での吸着試験の結果、エタノール濃度を上げると回収できる活性は漸減したが10%のエタノール存在下でも80%以上の活性を回収できた。カラムを用いて吸着可能な活性の量を検討した結果、5 mlのカラムを用いることにより1,600単位の酵素を90%以上回収できた。このようにして回収した酵素を再使用することにより効率の低下をおこさずにエタノール醗酵を行なうことができた(図12)。

II-3 *Chalara paradoxa* 菌体のアルギン酸ゲル固定化による生澱粉の分解⁸⁾

C. paradoxa 菌体の固定化を行ない、固定化菌体を用いた生澱粉の糖

化を試みた。液体培養して得られた胞子を集め懸濁液とし、等容量の5%アルギン酸ナトリウム溶液と混合した後、0.1 M CaCl_2 中に滴下して胞子を包括固定化したゲルビーズを得た。この胞子を包括したゲルビーズを数日間培養しゲルの表面に菌糸を増殖させたものを固定化菌体として生澱粉の糖化反応に供した(図13)。窒素源を栄養として反応液に加えることにより固定化菌体は連続的にアミラーゼを生産し、生澱粉を分解することを示した(図14)。

II-4 *Chalara paradoxa* プロトプラストの作成と再生⁹⁾

細胞融合あるいは遺伝子の導入などの方法を用いた菌株の改良の基礎とするために *C. paradoxa* 菌糸のプロトプラスト化を試みた。胞子を一晩静置培養後、得られた菌糸100 mgを0.5 Mマンニトールを浸透圧調節剤とした0.1%キチナーゼと0.1%ザイモリアーゼの混合液1 ml (20 mMリン酸緩衝液, pH 6.4)で処理すると反応時間60分で約 2.5×10^7 個/mlのプロトプラストを得た(表6)。このプロトプラストを0.5 Mスクロースを浸透圧調節剤とした培地で再生を行ない、約10%の再生率を得た(図15)。

結 論

生澱粉分解酵素である *Chalara paradoxa* グルコアミラーゼを精製してその性質を明らかにするとともにサブサイト構造、各種CDによる阻害等を検討し、本酵素の優れた生澱粉分解性は他の酵素と比較して活性部位が高分子のリガンドを受け入れ易いことに起因することを明らかにした。さらに、本酵素の澱粉粒の構造研究への応用について検討を行ない、澱粉粒の層状構造が単純な層状ではなく、層同士が一部で互いに連結した構造を持つことを明らかにした。別々に分離精製した *C. paradoxa* α -アミラーゼとグルコアミラーゼを用いて生澱粉の分解性を検討し、両酵素の組合せがさらに優れたものであることを示した。つづいて、本酵素を利用したトウモロコシ生澱粉の無蒸煮エタノール醗酵を検討した結果、高い収率でエタノールを生成することができた。このように、*C. paradoxa* 酵素標品は高い生澱粉分解活性のゆえに澱粉粒の構造研究等の基礎研究への応用、あるいは無蒸煮エタノール醗酵等の工業的利用への応用が可能であるという結論を得た。

原著論文

- 1) M.Monma, K.Mikuni, H.Ishigami and K.Kainuma, Purification of the Glucoamylase Components of *Chalara paradoxa* by Affinity Chromatography and Chromatofocusing. *Carbohydr. Res.*, 159, 255 (1987).
- 2) M.Monma, Y.Yamamoto and K.Kainuma, Subsite Structure of *Chalara paradoxa* Glucoamylase and Its Interaction with Cyclodextrins. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1503 (1989).
- 3) M.Monma and K.Kainuma, Preparation of *Chalara paradoxa* Glucoamylase Modified by Fluorescein-Isothiocyanate and Binding to Raw Starch. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2087 (1988).
- 4) M.Monma, Y.Yamamoto and K.Kainuma, Ultrastructure of Corn Starch-Granules Digested by *Chalara paradoxa* Glucoamylase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 37, 13 (1990).
- 5) M.Monma, Y.Yamamoto, N.Kagei and K.Kainuma, Raw-starch Digestion by α -Amylase and Glucoamylase from *Chalara paradoxa*. *Stärke*, 41, 382 (1989).
- 6) M.Monma, N.Kagei and K.Kainuma, Raw-starch Digestion by *Chalara paradoxa* Immobilized in Calcium Alginate Gels. *Stärke*, 41, 355 (1989).
- 7) K.Mikuni, M.Monma and K.Kainuma, Alcohol Fermentation of Corn Starch Digested by *Chalara paradoxa* Amylase without Cooking. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 729 (1987).
- 8) M.Monma, K.Mikuni and K.Kainuma, Repeating Use of *Chalara paradoxa* Amylase by Cyclodextrin Affinity Column. *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 404 (1988).
- 9) M.Monma and K.Kainuma, Preparation and Regeneration of *Chalara paradoxa* Protoplasts. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2669 (1986).

参考論文

- 1) T.Nakakuki, M.Monma, K.Azuma and K.Kainuma, Production of Extracellular Exo-Maltohexaohydrolase and Pullulanase from a Mutant of *Aerobacter aerogenes*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 29, 179 (1982).
- 2) T.Nakakuki, K.Azuma, M.Monma and K.Kainuma, Purification and Some Properties of an Extracellular Exo-Maltohexaohydrolase from an *Aerobacter aerogenes*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 29, 188 (1982).
- 3) T.Nakakuki, T.Hayashi, M.Monma, K.Kawashima and K.Kainuma, Immobilization of the Exo-Maltohexaohydrolase by the Irradiation Method. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 1095 (1983).
- 4) M.Monma, T.Nakakuki and K.Kainuma, Formation and Hydrolysis of Maltohexaose by an Extracellular Exo-Maltohexaohydrolase. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1769 (1983).
- 5) S.O.Yanagi, M.Monma, T.Kawasumi, A.Hino, M.Kito and I.Takebe, Conditions for Isolation and Colony Formation by Mycelial Protoplasts of *Coprinus macrorhizus*. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 171 (1985).
- 6) T.Takano, M.Fukuda, M.Monma, S.Kobayashi, K.Kainuma and K.Yamane, Molecular Cloning, DNA Nucleotide Sequencing, and Expression in *Bacillus subtilis* Cells of the *Bacillus macerans* Cyclodextrin Glucanotransferase Gene. *J. Bacteriol.*, 166, 1118 (1986).
- 7) H.Okemoto, S.Kobayashi, M.Monma, H.Hashimoto, K.Hara and K.Kainuma, Isolation and Cultivation of a Novel Microorganism Producing a Maltopentaose-Forming Enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 137 (1986).

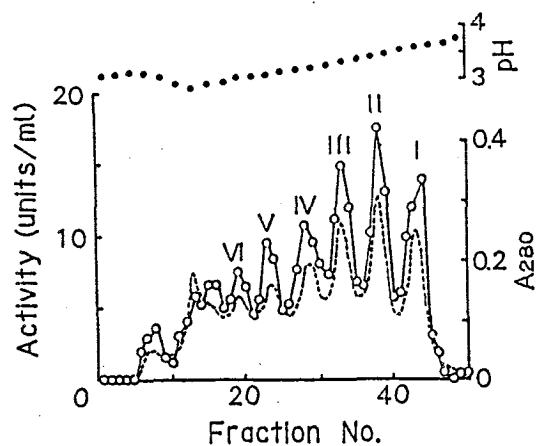


图 1. Chromatofocusing of *Chalara paradoxica* Amylase after Affinity Chromatography on α -CD-Sepharose 6B. \circ , amylase activity; ----, absorbance at 280 nm; \bullet , pH. Fractions 43-44, 38-39, 33-34, 28, 23, and 19 corresponded to peaks I-VI, respectively.

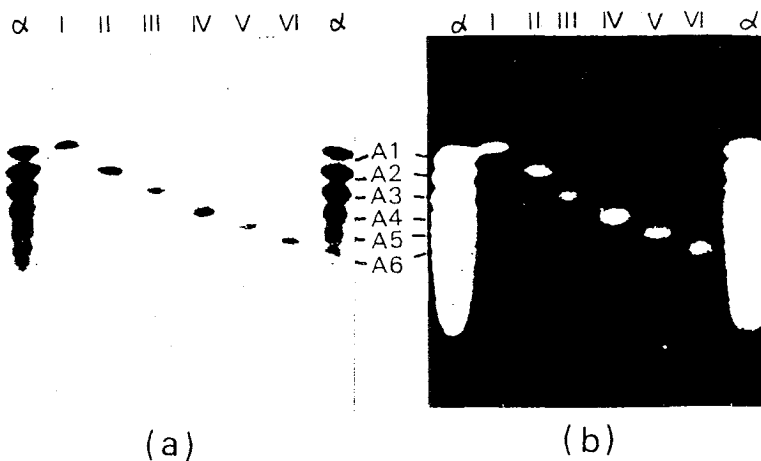


图 2. Isoelectric Focusing of the Materials in Peaks I-VI. Gel (a) was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, gel (b) was an amylase zymogram. α is the fraction obtained after affinity chromatography on α -CD-Sepharose 6B. The isoelectric points were: A1, 3.80; A2, 3.75; A3, 3.70; A4, 3.65; A5, 3.60 and A6, 3.55.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(A1)	Ala	Thr	Leu	Asp	Glu	Phe	Val	Asn	Thr	Glu	Arg
(A2)	Ala	Thr	Leu	Asp	Glu	Phe	Val	Asn	Thr	Glu	-
(A3)	Ala	Thr	Leu	Asp	Glu	Phe	Val	Asn	Thr	Glu	-

图 3. N-Terminal Amino Acid Sequences of *Chalara paradoxica* Glucoamylases.

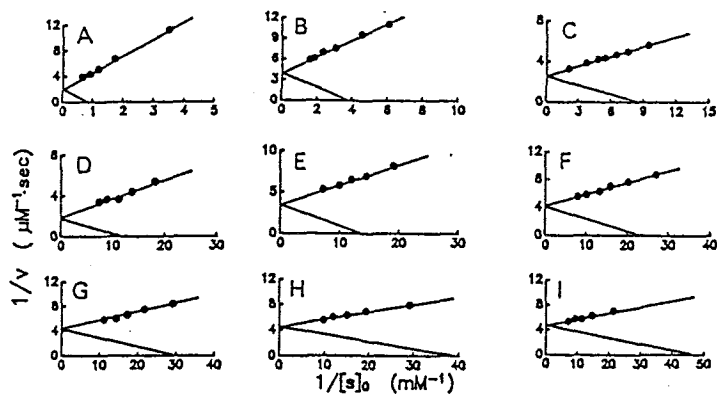


图 4. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of Various Maltodextrins by Glucoamylase A1 from *C. paradoxa*.
Substrate: maltose (A), maltotriose (B), maltotetraose (C), maltopentaose (D), maltohexaose (E), maltoheptaose (F), maltooctaose (G), maltononaose (H), maltodecaose (I). pH 5.0 at 25°C.

表 1. KINETIC PARAMETERS OF *Chalara paradoxa* GLUCOAMYLASE FOR HYDROLYSIS OF MALTODEXTRINS AT pH 5.0 AND 25°C

Substrate	K_m^a	V_{max}^b	c_0^c	k_0^d	k_0/K_m^e
Maltose	1.2	0.46	5.6	8.2	6.83
Maltotriose	0.29	0.25	1.4	17.9	61.7
Maltotetraose	0.12	0.38	1.4	27.1	226
Maltopentaose	0.091	0.50	1.4	35.7	392
Maltohexaose	0.074	0.29	0.7	41.4	559
Maltoheptaose	0.043	0.24	0.7	34.3	798
Maltooctaose	0.034	0.24	0.7	34.3	1009
Maltononaose	0.027	0.23	0.7	32.8	1215
Maltodecaose	0.022	0.21	0.7	30.0	1364

^a mM. ^b $\times 10^{-6}$ M sec⁻¹. ^c $\times 10^{-8}$ M. Concentration of the enzyme.

^d sec⁻¹. Molecular activity is expressed as V_{max}/c_0 . ^e sec⁻¹ mM⁻¹.

表 2. SUBSITE AFFINITY OF *Chalara paradoxa* GLUCOAMYLASE AT pH 5.0 AND 25°C

Subsite number (i)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Subsite affinity ^a (A_i)	0.05	4.99	1.30	0.77	0.33	0.21	0.21	0.14	0.11	0.07
k_{int} (sec ⁻¹)	77									

^a kcal/mole.

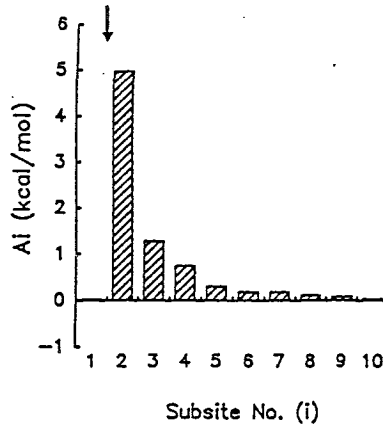


图 5. Histogram Showing the Subsite Affinities of *Chalara paradoxa* Glucoamylase. The arrow indicates the catalytic site.

表 3. KINETIC PARAMETERS OF GLUCOAMYLASE FOR G_2 - α -CD ACTIVITIES AT pH 5.0 AND 25°C

Glucoamylase	K_m^a	V_{max}^b	k_0^c	k_0/K_m^d
<i>Chalara paradoxa</i>	0.79	1.13	19.54	24.73
<i>Rhizopus niveus</i>	9.28	1.43	9.90	1.07

^a mM, ^b $\times 10^{-6}$ M sec⁻¹, ^c sec⁻¹, ^d sec⁻¹ mM⁻¹.

表 4. INHIBITOR CONSTANTS (K_i^a) OF CYCLODEXTRINS FOR GLUCOAMYLASE AT pH 5.0 AND 25°C

GLUCOAMYLASE	SOLUBLE STARCH			RAW RICE STARCH		
	α -CD	β -CD	γ -CD	α -CD	β -CD	γ -CD
<i>Chalara paradoxa</i>	8.9 \pm 1.8	1.4 \pm 0.5	3.9 \pm 0.9	9.0	1.2	1.61
<i>Rhizopus niveus</i>	0.9 \pm 0.2	1.6 \pm 0.8	22.3 \pm 4.5	ND ^b	ND	ND

^a mM, ^b Not determined.

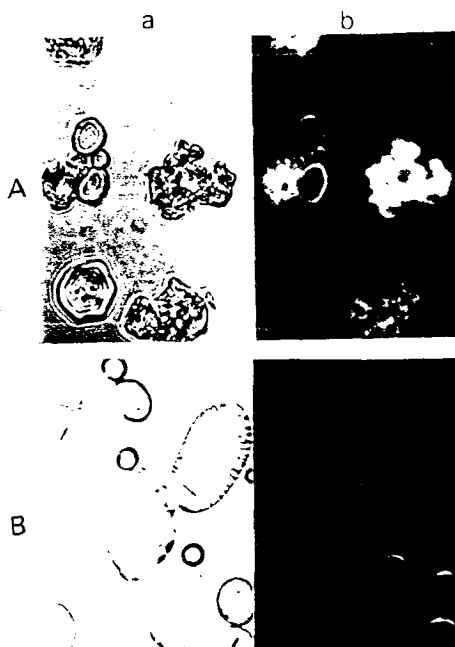


图 6. Micrographs of Corn (A) and Potato (B) Starch Mixed with Fluorescein-isothiocyanate Modified *C. paradoxa* Glucoamylase. Each 2% starch digested by native glucoamylase was mixed with 200 μ l of modified glucoamylase (about 36 μ g). a, normal micrograph. b, micrograph under fluorescence microscope.

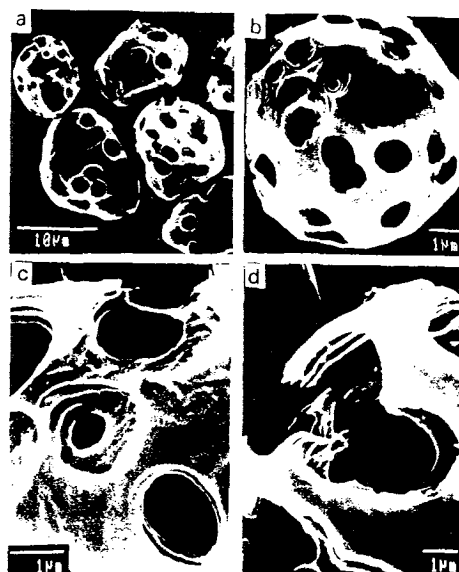


图 7. Scanning Electron Micrographs of Corn Starch-Granule Surface with Many Holes after Digestion by *Chalara paradoxa* Glucoamylase. (a) Low magnification micrographs showing several digested granules. (b), A digesting starch granule with many holes in various stages of digestion. (c) and (d), Higher magnified micrographs showing lamellar structure.

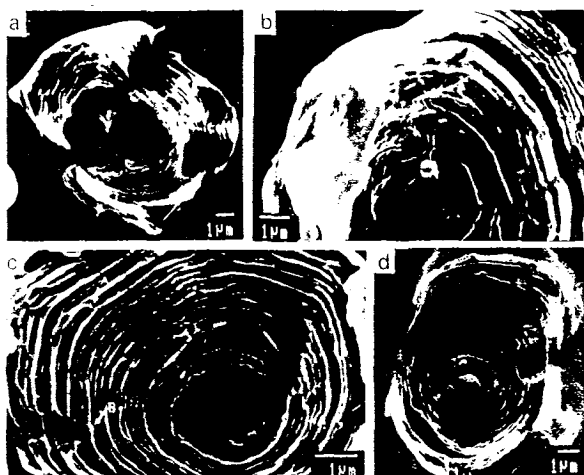


图 8. Scanning Electron Micrographs Showing Inner Structure of Corn Starch-Granules Digested by *Chalara paradoxa* Glucoamylase. (a), A whole granule with many holes and lamellar structure. (b), Lamellar structure of a granule with layers. (c), Lamellar structure of a granule with junctions between layers. (d), A granule after exposing the inside.

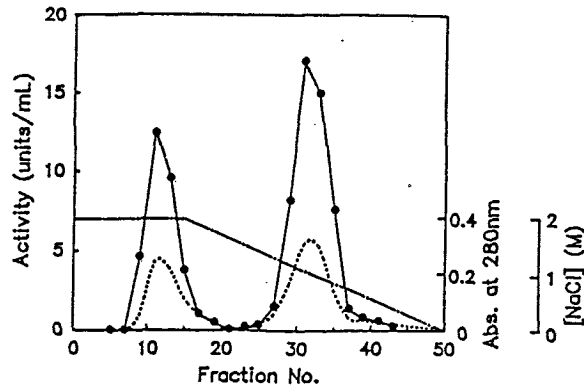


图 9. Chromatography of *Chalara paradoxa* Amylase on Butyl-Toyopearl 650M. Amylase activity (●), absorbance at 280 nm (----) and concentration of NaCl (---). First peak was α -amylase, and second peak was glucoamylase.

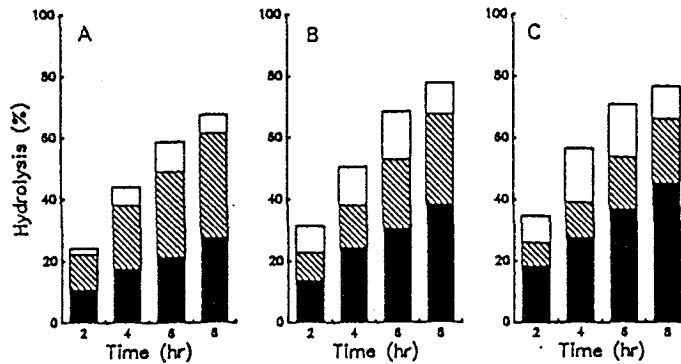


图 10. Cooperative Action of *Chalara paradoxa* Glucoamylase and α -Amylase. A, α -Amylase 75 units and glucoamylase 25 units. B, α -Amylase 50 units and glucoamylase 50 units. C, α -Amylase 25 units and glucoamylase 75 units. 2% of corn starch in 10ml of acetate buffer (pH 5.0) was incubated at 40°C. Glucoamylase (■), α -amylase (▨) and increment (□).

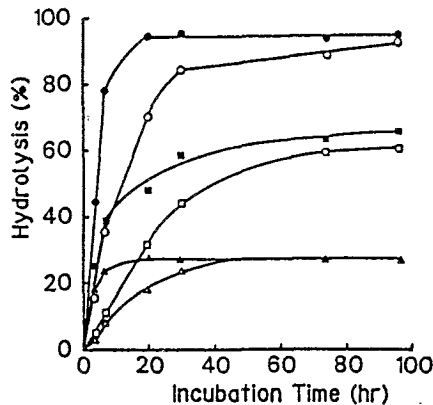


图 11. Effects of Concentration of Substrate and Condition of Shaking on Starch Hydrolysis.

C. paradoxa amylase preparation (1,795 units), 10 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 5.0), 90 ml of distilled water, and a few drops of toluene were mixed in a 500 ml Erlenmeyer flask and incubated at 40°C. (●), 10 g with shaking 140 rpm; (○), 10 g with shaking occasionally; (■), 30 g with shaking 140 rpm; (□), 30 g with shaking occasionally; (▲), 50 g with shaking 140 rpm; and (△), 50 g with shaking occasionally.

表 5. ETHANOL FERMENTATION AND YIELD FROM
RAW CORN STARCH WITHOUT COOKING
BY USING *Chalara paradoxa* AMYLASE PREPARATION^a

Strain	Total starch (g/50 ml)		CO ₂ formed ^b (g)	EtOH formed (g)	EtOH yield ^c (%)
	Before fermentation	After fermentation			
Baker's yeast ^d	6.7	0.1	3.4	3.3	86.8
Baker's yeast	8.8	0.1	4.1	4.2	84.0
Baker's yeast	13.1	3.1	4.8	4.7	63.5
Sake yeast ^e	6.7	0.1	3.2	3.5	92.1
Sake yeast	8.8	0.1	4.1	4.4	88.0
Sake yeast	13.1	0.5	6.0	6.0	81.1

^a Fermentation mixtures were incubated for five days at 30°C with shaking occasionally.

^b The CO₂ is the weight decrease by CO₂ gas formation.

^c The yield is the percentage of observed EtOH to theoretical EtOH.

^d Commercial product of Oriental Yeast Co., Japan.

^e *Saccharomyces sake* IFO 2164.

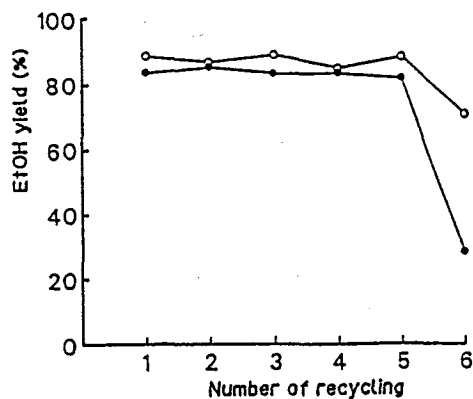


図 12. Effects of Repeating Use of *Chalara paradoxa* Amylase on Ethanol Fermentation.
Raw corn starch (1/50 ml) at (○) 7.5 g and (●) 10 g.

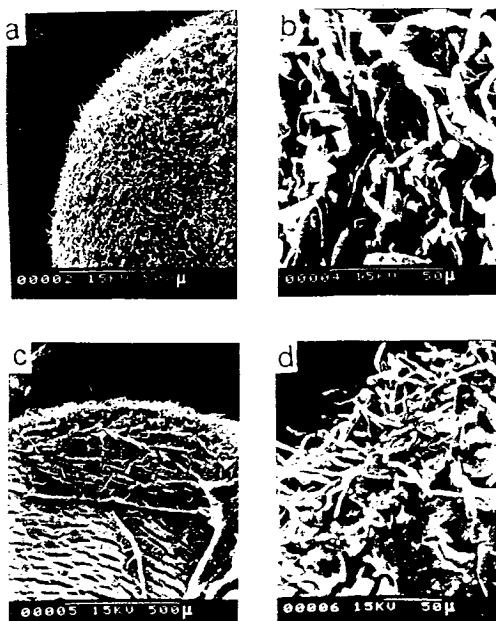


Fig 13. Scanning Electron Micrographs of Ca-Alginate Gel Bead Immobilized Growing *C. paradoxa*.
(a), (b) surface of a bead; (c), (d) cross section of a bead.

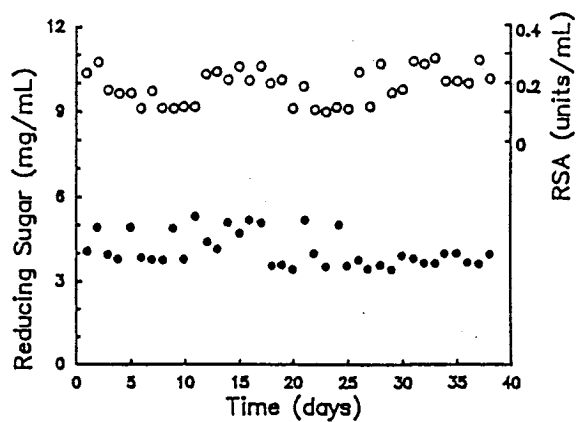


Fig 14. Repeating Use of the Immobilized Growing *C. paradoxa* for Batch-Wise Raw Corn Starch Digestion.
(●), Reducing sugar; (○), raw starch digestion activity (RSA).

表 6. RELEASE OF PROTOPLASTS FROM *Chalara paradoxa* MYCELIA
USING VARIOUS ENZYME
PREPARATIONS SINGLY AND IN COMBINATION^a

Enzyme Solution	Number of protoplasts per ml $\times 10^{-5}$			
	Duration of treatment (min)			120
	30	60	90	
A. Zymolyase 60000 (0.1%)	ND ^b	ND	ND	ND
B. Chitinase (4 U/ml)	10	10	10	10
C. Cellulase Onozuka R-10 (1%)	ND	ND	ND	ND
D. Zymolyase 60000 (0.1%) + Chitinase (4 U/ml)	188	254	168	148
E. Zymolyase 60000 (0.1%) + Cellulase Onozuka R-10 (1%)	10	10	10	10
F. Chitinase (4 U/ml) + Cellulase Onozuka R-10 (1%)	ND	ND	ND	ND
G. Zymolyase 60000 (0.1%) + Chitinase (4 U/ml) + Cellulase Onozuka R-10 (1%)	210	206	150	146

^a Mycelia of 100 mg wet weight were treated at 30°C with 1 ml of enzyme solution containing 0.5 M mannitol and 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.4).

^b Not detectable.

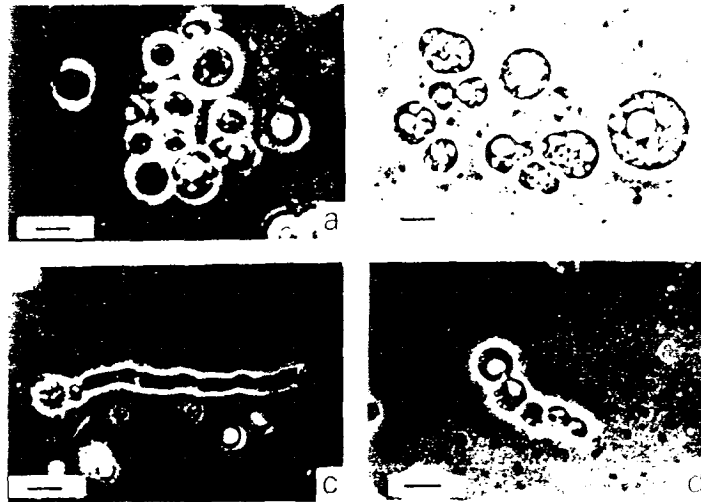


图 15. Mycelial Protoplasts of *Chalara paradoxa* and Their Regeneration.
(The bar represents 15 μ m.)

a: Freshly isolated protoplasts.

b: Protoplasts after 5 hr incubation with standard enzyme solution.

c: Normal regeneration form of a protoplast after 8 hr in regeneration medium.

d: Bud-like regeneration of a protoplast.

審査結果の要旨

植物の光合成により生産される澱粉は、現在食料資源、工業原料として重要であるばかりではなく、未来社会において石油に代るエネルギー源となるエタノールの原料として世界的に注目を集めている。本研究はエタノールを製造する際に澱粉を熱処理せず生澱粉のままで糖下する微生物 *Chalara paradoxa* の生澱粉分解酵素系につき、分子レベルにおいて詳細な酵素化学的検討を加え、本酵素を用いた無蒸煮エタノール醸酵への途を拓いたものである。

本研究は、サゴヤン樹幹より分離したカビ *C. paradoxa* の生産するグルコアミラーゼ分子を高度に精製し、マルトオリゴ糖を基質に反応速度論的解析を加え、本酵素の基質に対する高い親和力は基質の非還元性末端から第二位の糖鎖に対応する活性中心残基であることを明らかにした。さらに、本酵素は生澱粉分解活性のない酵素より立体的に大きな基質を結合し易い特性を持つことを明らかにし、本酵素の生澱粉分解活性を考察した。本グルコアミラーゼによる生澱粉分解の状況を電子顕微鏡により解析し、トウモロコシ澱粉粒にアミラーゼの分解を受け易い層と分解を受け難い層が交互に繰返している層状構造であることを明らかにした。次いで、本研究者は α -アミラーゼを精製した。 α -アミラーゼは、コメ、トウモロコシ、サゴ、ジャガイモの順に各生澱粉を分解した。 α -アミラーゼとグルコアミラーゼの相乗効果による生澱粉分解が著しいことを明らかにした。

上記の基礎的な酵素化学的知見をふまえて、*C. paradoxa* 酵素系によりトウモロコシ生澱粉を分解し無蒸煮エタノール醸酵への反応を検討し、最適条件下での醸酵で85%以上のエタノール収率を上げることができた。工業的な利用への展開のため、 α -シクロデキストリンをリガンドとする固定化担体に酵素を吸着回収させる方法確立した。さらに、製造原価を低くするため、*C. paradoxa* の菌体をアルギン酸ゲルに固定化し、連続的に生澱粉を分解するバイオリクターを構築した。将来の分子育種の基礎として *C. paradoxa* の菌体よりプロトプラストを作成し、これを再生させることを可能とした。

以上述べたように、本研究は生澱粉分解性を持つ *Chalara paradoxa* のアミラーゼ系の詳細な酵素化学的検討を行い、そして生澱粉分解による無蒸煮アルコール醸酵への応用を可能にしたもので、よって、審査員一同本研究者に対して農学博士の学位を授与するに価するものと認定した。